

## Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas

FABIANA A. MOREDO<sup>1</sup>\*, JAVIER A. CAPPUCCIO<sup>2</sup>, LUCAS INSARRALDE<sup>2</sup>, CARLOS J. PERFUMO<sup>2</sup>,  
MARÍA A. QUIROGA<sup>2</sup>, GERARDO A. LEOTTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología, <sup>2</sup>Cátedra de Patología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118, (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires. <sup>3</sup>IGEVET CCT - La Plata - CONICET. Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: fmoredo@fcv.unlp.edu.ar

### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue caracterizar mediante PCR 47 aislamientos de *Escherichia coli* recuperados de 32 cerdos con diagnóstico clínico de diarrea posdestete (DPD) y de 3 cerdos con enfermedad de los edemas (ED). Sobre 44 aislamientos provenientes de cerdos con DPD, 42 (95,5 %) fueron caracterizados como *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC) y 2 (4,5 %) como *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC). Catorce aislamientos de ETEC (33,3 %) fueron positivos para los genes *estI/estII/fedA*. El genotipo más complejo fue *eltA/estII/east1/faeG/aidA*. Los aislamientos provenientes de cerdos con ED se clasificaron como STEC porcinos y fueron portadores de *stx<sub>2e</sub>/aidA*. Once aislamientos (25 %) fueron portadores del gen que codifica la expresión de la adhesina AIDA-I. Sin embargo, en ningún aislamiento se detectaron los genes que codifican la expresión de las adhesinas F5, F6, F41, de intimina y de "Paa". La prevención de la DPD y de la ED podría realizarse mediante el desarrollo de vacunas que generen anticuerpos contra las adhesinas de las cepas de *E. coli* prevalentes en la Argentina.

**Palabras clave:** ETEC, STEC, diarrea posdestete, enfermedad de los edemas, cerdos

### ABSTRACT

**Genotypic characterization of toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea (PWD) and edema disease (ED).** The purpose of this work was to characterize 47 *Escherichia coli* strains isolated from 32 pigs diagnosed with postweaning diarrhea and three pigs with edema disease by PCR. Forty two (95.5 %) of the strains isolated from diarrheic pigs were characterized as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and 2 (4.5 %) as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Fourteen (33.3 %) ETEC strains were positive for *estI/estII/fedA* genes. The most complex genotype was *eltA/estII/faeG/aidA*. Strains isolated from pigs with ED were classified as porcine STEC and were *stx<sub>2e</sub>/aidA* carriers. Eleven (25 %) strains carried the gene encoding adhesin protein AIDA-I. However, genes coding for F5, F6, F41, intimin and Paa were not detected. The development of vaccines generating antibodies against prevalent *E. coli* adhesins in Argentina could be useful for the prevention of PWD and ED.

**Key words:** ETEC, STEC, postweaning diarrhea, edema disease, pigs

La diarrea posdestete (DPD) es una entidad de distribución mundial en granjas de cerdos en confinamiento (5). Sumado a factores ambientales, sociales y nutricionales (5), en la DPD actúa como agente desencadenante *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC), aunque también pueden estar involucradas cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) (10).

Los microorganismos del grupo ETEC se caracterizan por la producción de adhesinas fimbriales y enterotoxinas. Estas últimas se clasifican en termolábil (LT) y termoestables (STa, STb y EAST1) (5). En la DPD, estos agentes colonizan el intestino delgado de los lechones en las primeras horas posteriores al destete, adhiriéndose a las microvellosidades

de los enterocitos a través de alguno de sus factores fimbriales, particularmente F4 y F18 (3, 5).

El grupo STEC comprende cepas de *E. coli* positivas para el factor de adhesión F18, las cuales producen una variante de toxina Shiga, la Stx<sub>2e</sub>, que se asocia a la enfermedad de los edemas (ED) (10). La Stx<sub>2e</sub> producida en el intestino delgado se absorbe y se une a su receptor glicolipídico (Gb4) que se encuentra localizado sobre las células endoteliales, esto produce angiopatía degenerativa con aumento de la permeabilidad capilar y la presencia de edema en el meso, el estómago, el subcutis y el encéfalo; en este último caso se observan desórdenes neurológicos (11).

Recientemente se describió la presencia de un

nuevo subgrupo de ETEC aislados de cerdos con DPD o ED, negativos a factores de colonización fimbriales, pero que expresan una adhesina no fimbrial relacionada con la adherencia difusa, la AIDA-I (10). La AIDA-I puede expresarse como única adhesina o conjuntamente con F18 (5, 7). Leclerc *et al.* (7) observaron la aparición de nuevos factores de virulencia en cepas ETEC, como el denominado Paa (*porcine attaching and effacing associated*), originalmente asociado a cepas de *E. coli* enteropatógenas porcinas (PEPEC).

En la Argentina, la información sobre los patotipos y genotipos asociados a DPD y ED es escasa. Si bien se cuenta con datos acerca de la frecuencia de las toxinas LT, STa, STb y Stx2e (9, 13), no se dispone de información acerca de factores de colonización, especialmente los no fimbriales. El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización genotípica de aislamientos de *E. coli* recuperados de cerdos con diagnóstico clínico y anatomopatológico de DPD o ED.

Durante los meses de febrero y marzo de 2010 y febrero de 2011, se obtuvieron 47 aislamientos de *E. coli* toxigénicos a partir de 32 cerdos de la categoría posdestete (21 a 42 días de vida) con signología clínica característica de DPD, y de 3 cerdos con diagnóstico clínico de ED. Los cerdos pertenecían a siete granjas de producción porcina en confinamiento, localizadas en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Por cada granja se analizaron entre 3 y 9 cerdos (Tabla 2). El aislamiento y la caracterización fenotípica se realizaron utilizando la metodología previamente descrita (9). Se seleccionaron entre 5 y 10 colonias características de *E. coli* con diferente perfil fenotípico, por cada animal. En las muestras de los 35 cerdos se identificó al menos un genotipo de *E. coli* toxigénico. Para la caracterización genotípica de ETEC y STEC, se utilizó PCR en tiempo final (1, 2, 6, 10). Del total de aislamientos analizados, 44 se obtuvieron a partir de animales con DPD y 3 de ejemplares con ED. Se utilizó como ADN templado una colonia de cada aislamiento en estudio, lisada durante 15 minutos a 100 °C en 150 µl de *buffer* Tris-EDTA/Tritón. En la Tabla 1 se describen los genes analizados, las secuencias de oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados. Se utilizaron como cepas de referencia *E. coli* 7805 (*eltA/estI/estII/faeG/east1*), *E. coli* 81-603 A (*fasA*), *E. coli* 1073 B44 (*fanC/F41*), *E. coli* 88-1199 (*fedA*), *E. coli* LS77-1 I (*stx<sub>2e</sub>*) y *E. coli* EDL933 (*eae/paa*).

De los 44 aislamientos provenientes de cerdos con DPD, 42 (95,5 %) se clasificaron como ETEC y 2 (4,5 %) como STEC porcinos, estos últimos presentaron como único gen marcador de virulencia *stx<sub>2e</sub>*. Catorce

aislamientos ETEC (33,3 %) fueron positivos para los genes que codifican STa/STb/F18. Esta combinación se observó en tres de las siete granjas estudiadas (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe). Siete aislamientos ETEC (16,6 %) fueron positivos para la combinación de genes que codifican STa/STb.

El genotipo más complejo fue *eltA/estII/east1/faeG/aidA* (N = 1), seguido por *eltA/estII/east1/faeG* (N = 1), *estI/estII/fedA/aidA* (N = 5), *eltA/estI/estII/east1* (N = 1), *eltA/estII/east1* (N = 1), *east1/aidA* (N = 7).

El gen que codifica la enterotoxina enteroagregativa termoestable 1 (EAST1) se detectó en 16 cepas ETEC (36,4 %), pero solo en 7 fue este el único marcador de virulencia. Las 3 cepas aisladas a partir de cerdos con ED se clasificaron como STEC porcinos y presentaron la combinación de genes *stx<sub>2e</sub>/aidA*.

Entre los genes que codifican la expresión de adhesinas, el más frecuente fue el que codifica la expresión de la adhesina fimbrial F18 (40,4 %), seguido por el gen que codifica F4 (4,2 %). Todos los aislamientos estudiados fueron negativos al investigar los genes que codifican las fimbrias F5, F6, F41 y las adhesinas afimbriales intimina y Paa. En la Tabla 2 se presentan los diferentes genotipos encontrados en cada granja.

Estos resultados coincidieron con lo encontrado en EE.UU. asociados a animales con DPD (14). Al igual que en el presente trabajo, MatiuZZi *et al.* (8) hallaron un mayor porcentaje de cepas aisladas de animales con DPD portadoras del gen que codifica las toxinas STb (68,1 %), seguido por el gen que codifica STa (61,4 %). En un estudio previo realizado en la Argentina, se detectó *estI* solo en el 21,3 % de los aislamientos (13). En el presente trabajo se detectó el gen *eltA* (toxina LT) en el 9 % de los aislamientos analizados, un porcentaje menor que el descrito en otros estudios (8, 13).

En este trabajo fue posible identificar el gen que codifica la expresión de la adhesina AIDA-I en 11 de los 44 aislamientos provenientes de animales con DPD (25 %) y en 3 aislamientos recuperados de animales con ED. En este último caso, se lo detectó como único factor de colonización. Niewerth *et al.* (11) demostraron la importancia de esta adhesina no fimbrial en asociación con F18 y Stx2e en la patogénesis de la DPD y de la ED. Respecto de la producción de la EAST1, se observó la presencia del gen que la codifica en diferentes combinaciones

**Tabla 1.** Genes analizados y secuencias de los oligonucleótidos cebadores utilizados para la caracterización de los aislamientos ETEC y STEC recuperados de cerdos con DPD y ED

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Referencia
<i>faeG</i>	F4-Fw F4-Rv	GGTGATTTCATGGTTTCG ATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG	764	2
<i>fanC</i>	F5-Fw F5-Rv	TGGGACTACCAATGCTTCTG TATCCACCATTAGACGGAGC	450	2
<i>fasA</i>	F6-Fw F6-Rw	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG AACTCCACCGTTTGTATCAG	333	2
<i>fedA</i>	F18-Fw F18-Rv	GTGAAAAGACTAGTTTATTTTC CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC	510	2
<i>F41</i>	F41-Fw F41-Rv	GAGGGACTTTTCATCTTTTAG AGTCCATTCCATTATAGGC	431	2
<i>paa</i>	Paa-Fw Paa-Rv	ATGAGGAAACATAATGGCAGG TCTGGTCAGGTCGTCAATAC	350	2
<i>aidA</i>	AIDA-I-F AIDA-I-R	ACAGTATCATATGGAGCCA TGTGCGCCAGAACTATTA	585	10
<i>eae</i>	EAE-Fw EAE-Rv	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	864	6
<i>eltA</i>	LTA-1 LTA-2	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	2
<i>estI</i>	STa1 STa2	TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG ACAGGCAGGATTACAACAAAG	166	2
<i>estII</i>	STb1 STb2	ATCGCATTTCTTCTTGCATC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172	2
<i>east1</i>	East11a East11b	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	111	2
<i>stx2e</i>	Stx2eA Stx2eB	CCTTAACATAAAAGGAATATA CTGGTGGTGTATGATTAATA	230	1

DPD: diarrea posdestete; ED: enfermedad de los edemas

**Tabla 2.** Genotipos de los aislamientos ETEC y STEC recuperados de cerdos con DPD o ED.

Granja	Localización	Cuadro clínico	Animales analizados	Genotipo	Aislamientos
1	Buenos Aires	DPD	9	<i>stx<sub>2e</sub></i>	2
				<i>estI/estII/fedA/aidA</i>	3
				<i>estI/estII/fedA</i>	8
2	Santa Fe	DPD	6	<i>estI/estII/fedA/aidA</i>	2
				<i>estI/estII/fedA</i>	1
				<i>estI/estII</i>	7
3	Santa Fe	DPD	3	<i>eltA/estII/east1/faeG/aidA</i>	1
				<i>eltA/estII/east1/faeG</i>	1
4	Santa Fe	DPD	3	<i>eltA/estI/estII/east1</i>	1
				<i>eltA/estII/east1</i>	1
5	Córdoba	DPD	8	<i>east1/aidA</i>	5
				<i>east1</i>	7
6	Córdoba	DPD	3	<i>estI/estII/fedA</i>	5
7	Buenos Aires	ED	3	<i>stx<sub>2e</sub>/aidA</i>	3

DPD: diarrea posdestete; ED: enfermedad de los edemas

(Tabla 2). Si bien está en discusión su valor cuando se presenta solo, en este estudio se lo observó asociado a los genes que codifican la toxina STb o el factor de adherencia AIDA-I en 9 cepas, por lo que podría considerarse como importante marcador de virulencia de *E. coli* asociado a DPD. Es interesante mencionar que en estudios previos se demostró asociación de F4/LT/STa y STb/EAST1 con casos de DPD (11, 12).

Los datos obtenidos aportan nueva información sobre los patotipos y genotipos de *E. coli* asociados a DPD y ED en nuestro país, y constituye el primer relevamiento de factores de colonización fimbriales y no fimbriales. El reconocimiento de los factores de virulencia y adherencia de las cepas de *E. coli* toxigénicas asociadas a DPD y ED en granjas de cría intensiva de cerdos permitirá implementar medidas de prevención tendientes a controlar el estado sanitario de las piaras. En ese contexto sería de gran valor el desarrollo de vacunas que generen anticuerpos contra las adhesinas de las cepas de *E. coli* productoras de DPD y de ED prevalentes en la Argentina.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen al Dr. Gustavo Zielinski y a la Dra. Nora Lía Padola por la remisión de cepas de referencia. Trabajo parcialmente financiado con subsidio PICT 2005 N.º de resolución BID 1728 OC/AR PICT 2005-33987 Resolución Directorio ANPCyT 217/2006 otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación y subsidio perteneciente al Proyecto de Incentivos a Docentes-Investigadores V184, otorgado por la Universidad Nacional de La Plata.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco M, Blanco J, González E, Mora A, Jansen W, Gomes T, Zerbini F, Yano T, Pestana de Castro AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. J Clin Microbiol 1997; 35: 2958-63.
2. Chapman T, Wu X, Barchia I, Bettelheim K, Driesen S, Trott D, Wilson M, Chin JJ. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 4782-95.
3. Dubreuil J. STb and AIDA-I: The missing link? Critical Rev Microbiol 2010; 1-9.
4. Dubreuil J. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. FEMS Microbiol Lett 2008; 278: 137-45.
5. Fairbrother J, Nadeau E, Gyles C. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev 2005; 6: 17-39.
6. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. J Clin Microbiol 1993; 31: 1200-5.
7. Leclerc S, Boerlin P, Gyles C, Dubreuil J, Mourez M, Fairbrother J, Harel J. *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. Res Microbiol 2007; 158: 97-104.
8. Matiuizi da Costa M, Sá e Silva M, Spricigo D, Mazzini Witt N, Beutinger Marchioro S, Kolling L, Palmira A, de Vargas C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. Pesq Vet Bras 2006; 26: 5-8.
9. Moredo F, Vigo G, Sanz M, Aguirre J, Armocida A, Perfumo C. Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros clínicos de diarrea pre y postdestete. Analecta Vet 1998; 18: 29-34.
10. Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton D, Fairbrother J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. J Vet Diagn Invest 2003; 15: 242-52.
11. Niewerth U, Frey A, Voss T, Le Bouguénec C, Baljer G, Franke S, Schmidt A. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. Clin Diag Lab Immunol 2001; 8: 143-9.
12. Osek J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli*/heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea. Vet Microbiol 2003; 91: 65-72.
13. Parma A, Sanz M, Viñas M, Cicuta M, Blanco J, Boehringer S, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J, Blanco M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. Vet Microbiol 2000; 72: 269-76.
14. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. Vet Microbiol 2007; 123: 145-52.